Studien über die Anwendung der strömenden Adsorption (Chromatographie) zur Reinigung und Konzentrierung bakterieller Toxine

---

Inaugural-Dissertation

der

medizinischen Fakultät der Universität Bern

zur

Erlangung der Würde eines Doctor pharmaciae

vorgelegt von

Renato Ballinari

Monteggio (Tessin)

Bern — Gedruckt bei Stämpfli & Cie. — 1941

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547622_0070

Studien über die Anwendung der strömenden Adsorption (Chromatographie) zur Reinigung und Konzentrierung bakterieller Toxine

---

Inaugural-Dissertation

der

medizinischen Fakultät der Universität Bern

zur

Erlangung der Würde eines Doctor pharmaciae

vorgelegt von

Renato Ballinari

Monteggio (Tessin)

Von der medizinischen Fakultät auf Antrag des Herrn Professor Dr. Hallauer angenommen.

Bern, den 23. Mai 1941.

Der Dekan: *Professor Bluntschli.*

2P5

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

An dieser Stelle möchte ich die angenehme Pflicht erfüllen, meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Prof. Dr. Hallauer und Herrn Privatdozent Dr. Regamey, für die wohlwollende Förderung und liebenswürdige Unterstützung dieser Arbeit meinen besten Dank auszusprechen.

Meinen lieben Eltern gewidmet

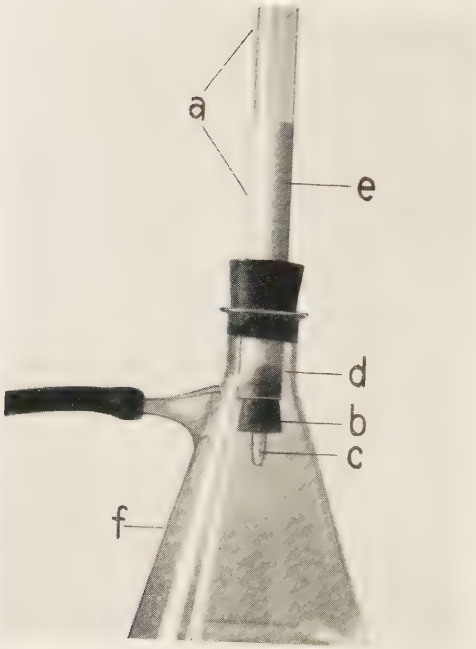
Einleitung

Die von *Willstätter* zur Reinigung und Konzentrierung von Enzymen inaugurierte Methode der selektiven Adsorption und Elution hat sich bekanntlich auch zur Lösung bakteriologischer und immunologischer Fragen in zunehmendem Masse eingebürgert. In neuerer Zeit ist es auch gelungen, durch Adsorption bakterieller Toxine bzw. Anatoxine und Virusarten an geeignete Adsorbentien hochwirksame Impfstoffe herzustellen. Die Leistungsfähigkeit dieser «ruhenden Adsorption» ist nun aber beschränkt; verzichtet man nämlich auf die Verwendung selektiver Adsorptions- und Elutionsmittel, so ist die Trennung eines Stoffgemisches in seine einzelnen Komponenten nicht möglich, und der Konzentrierung eines einheitlichen Stoffes sind ebenfalls praktische Grenzen gesetzt, da sich die zu adsorbierende Substanz auf die Menge des zugesetzten Adsorbens gleichmässig verteilt. Demgegenüber bietet die von *Tswett* 1) ausgearbeitete «chromatographische Adsorptionsmethode», die im Prinzip darin besteht, dass die zu adsorbierende Flüssigkeit gezwungen wird, das in Form einer Säule aufgeschichtete Adsorbens in einer Richtung zu durchlaufen, wesentliche Vorteile. Wird nämlich ein Gemisch von Farbstoffen einer solchen «strömenden Adsorption» unterworfen, so werden die einzelnen Farbstoffe zufolge ihrer unterschiedlichen Adsorptionsaffinitäten in der Adsorptionssäule räumlich voneinander getrennt, so dass sich schliesslich ein «Chromatogramm», bestehend aus verschiedenen, räumlich getrennten, mehr oder weniger eng begrenzten Farbringen, ergibt. Durch die Elution mechanisch isolierter Farbzonen ist es auf diese Art jederzeit möglich, ein Farbstoffgemisch in seine Komponenten zu zerlegen bzw. zu analysieren.

Nachdem seit *Tswett* festgestellt wurde, dass sich diese «chromatographische Adsorptionsanalyse» nicht nur zur Isolierung von in organischen Solventien löslichen bzw. wasserlöslichen Farbstoffen, sondern auch von ungefärbten Stoffen eignet, war der strömenden Adsorptionsmethode ein weites Anwendungsgebiet erschlossen. Die strömende Adsorptionsanalyse hat denn auch bei der Isolierung,

Reinigung und Konzentrierung natürlich vorkommender, pflanzlicher und tierischer Farbstoffe, von Enzymen, Vitaminen, Hormonen, bereits hervorragende Dienste geleistet (vgl. *Zechmeister* und *Cholnoky* 2)).

Dass die chromatographische Adsorption auch für bestimmte bakteriologische und immunologische Arbeiten wesentliche Vorteile bringen und möglicherweise die bisher geübte ruhende Adsorption verdrängen wird, ist demnach zu erwarten. Bisher liegt nun aber — meines Wissens — nur eine einzige Arbeit von *Gözsy* und *Vásárhelyi* 3), in der die Leistungsfähigkeit der strömenden Adsorption für die Reinigung von Tuberkulin untersucht wurde, vor. Es erschien daher angezeigt, das chromatographische Verhalten bakterieller Toxine (Tetanus- und Diphtherietoxin) zu prüfen, wobei zunächst die Versuchsbedingungen, unter denen eine optimale Adsorption bzw. Elution erzielt werden kann, ermittelt werden sollten.


a
e
d
b
c
f

Versuchstechnik

Apparatur vgl. nebenstehende Abbildungen.

Adsorptionsrohr (a) bestand aus einer dickwandigen Glasröhre von 200—300 mm Länge und 15 mm Durchmesser. Der untere Verschluss des Rohres erfolgte mit einem gelochten Gummistopfen (b), durch den ein kurzes und enges Glasröhrenstück (c) führte, das seinerseits durch eine Watteeinlage (d) gegenüber dem Adsorbens (e) abgedichtet war. Das Adsorptionsrohr wurde mittels eines gelochten Gummistopfens auf einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Saugflasche (f) befestigt.

Adsorptionsmittel. In den Versuchsserien 1—33 wurde Aluminiumhydroxyd ($Al(OH)_3$) reinst, alkalifrei von Merck, in allen übrigen Versuchen Aluminiumoxyd (Al_2O_3) puriss. von Merck verwendet.

Die *Beschickung der Adsorptionsröhre* erfolgte in den Versuchsserien 1—33 durch sorgfältiges Einstopfen des trockenen Adsorbens in die Adsorptionsröhre. In den spätern Versuchen wurde dagegen das Adsorptionsmittel in Form einer bereits gepufferten Suspension eingefüllt und durch nachträgliches Absaugen der Suspensionsflüssigkeit in eine noch eben feuchte Adsorptionssäule übergeführt.

Wasserstoffionenkonzentration. Die zur optimalen Adsorption notwendige saure Reaktion wurde durch ein entsprechendes Ansäuren des Toxins mit Salzsäure und in den spätern Versuchen auch durch eine ausgiebige Vorbehandlung des Adsorbens mit Phosphatpufferlösung nach Sörensen (in einzelnen Fällen auch mit Milchsäurenatriumazetat) gewährleistet.

Als Elutionsmittel wurde alkalischer Phosphatpuffer (oder oft auch nur mit Natronlauge alkalisierte Kochsalzlösung) verwendet.

Sämtliche pH-Bestimmungen wurden kolorimetrisch ausgeführt.

Toxinauswertung. Die Toxine wurden im Tier — und gelegentlich auch im Flockungsversuch — geprüft.

Versuche mit Tetanustoxin

1. Versuchsserie: Es sollte ermittelt werden, bei welchem pH eine optimale Adsorption von Tetanustoxin an Aluminiumhydroxyd zu erzielen ist.

Versuchsanordnung. Als Adsorbens diente trockenes Aluminiumhydroxyd, das in einer Schichthöhe von je 10 cm in die Adsorptionsröhre hineingestopft wurde. Vor dem Versuch wurde die Säule mit je 15 cc einer Phosphatpufferlösung von variablem pH vorbehandelt. Anschliessend wurden je 15 cc Toxin (1 cc Toxin + 14 cc Pufferlösung eines entsprechenden pH) unter einem Vakuum von 90 mm Unterdruck durch die Adsorptionssäule geschickt und schliesslich noch mit je 20 cc der entsprechenden Pufferlösung nachgespült. Die Wasserstoffionenkonzentration der Untersuchungsflüssigkeit wurde jeweils vor der Adsorption bestimmt und als «Eingangs-pH» (E pH) bezeichnet. Die ebenfalls bestimmte Wasserstoffionenkonzentration des adsorbierten Filtrates wurde als «Ausgangs-pH» (A pH) registriert. Das verwendete Tetanustoxin vermochte weisse Mäuse bei subkutaner Applikation in einer Verdünnung von 1 : 25 000 regelmässig am 3. Tag zu töten. Während des Adsorptionsvorganges erfuhr das Toxin (durch die vorgängige Verdünnung und den Zusatz von Pufferlösung) eine Verdünnung von 1 : 50.

Die Stärke der Adsorption wurde zunächst lediglich durch die Menge des im Filtrat nachweisbaren Toxins beurteilt. Hierzu wurden weisse Mäuse mit jeweils drei Filtratverdünnungen (1 : 100, 1 : 1000 und 1 : 10 000) injiziert und festgestellt, in welcher Zeit der Tetanustod eintrat bzw. ob Tetanussymptome zu beobachten waren. Welchen Einfluss die Wasserstoffionenkonzentration auf den Adsorptionsvorgang ausübt, geht aus Tabelle I hervor.

Aus den Versuchen 1—11 geht mit Eindeutigkeit hervor, dass die Adsorption von Tetanustoxin an Aluminiumhydroxyd

Tabelle I

Versuchsserie 1—11

Tetanustoxin 1:50
Adsorbens: $Al(OH)_3$
Höhe der Adsorptionsschicht: 10 cm

Versuchs-Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Eingangs-pH		8,05	7,48	7,22	7,14	6,65	6,25	6,15	6,05	5,9	5,65	4,04
Ausgangs-pH		>8,4	>8,4	>8,4	>8,4	>8,4	>8,4	>8,4	>8,4	>8,4	>8,4	5,59
Toxingehalt des Filtrates *)	1:100	† 1	† 1	† 1	† 2	† 1	† 1	† 3	—	—	—	—
	1:1 000	† 2	† 1	† 1	† 2	† 2	† 2	—	—	—	—	—
	1:10 000	† 2	+	† 2	† 5	† 2	+	—	—	—	—	—

*) Die Indizes hinter † geben an, nach wieviel Tagen der Exitus der Versuchstiere erfolgte.
+ bedeutet Tetanussymptome bei Überleben der Versuchstiere.
— bedeutet völlig negativer Giftnachweis.

— erwartungsgemäss — in hohem Grade von der Wasserstoffzahl abhängig ist, in einem pH-Gebiet von 8.05—6.65 blieb jede Adsorption aus, in der Zone von pH 6.25—6.15 war die Adsorption nur geringfügig, dagegen wurde das Toxin im noch stärker sauren Milieu (pH 6.05—4.04) vollständig vom Adsorbens zurückgehalten.

Der jeweilige Vergleich zwischen Eingangs- und Ausgangs-pH lässt erkennen, dass sich die Wasserstoffionenkonzentration während des Adsorptionsvorganges durch Alkaliabgabe von seiten des Adsorbens stets wesentlich nach der alkalischen Seite verschiebt. Die wunschbare Konstanterhaltung des pH wurde demnach in dieser Versuchsanordnung noch nicht erreicht.

2. *Versuchsserie.* Nachdem festgestellt wurde, dass eine ausreichende Adsorption nur im stärker sauren Gebiet zustande kommt, wurden weitere Versuche angestellt, in denen das pH auf ca. 6.0 eingestellt wurde und in denen nun nicht nur das Filtrat, sondern auch die verschiedenen Segmente der Adsorptionssäule auf den Gehalt an Tetanustoxin geprüft wurden.

Die hierbei getroffene Versuchsanordnung entsprach im wesentlichen der vorherigen (Adsorbens: $Al(OH)_3$; Phosphatpufferlösung von pH 6.15—5.9; schliessliche Toxinverdünnung 1 : 50).

Die Adsorptionssäule wurde dagegen auf 2,5 cm bis 5 cm Höhe verkürzt, nach abgeschlossener Adsorption aus dem Glasrohr herausgestossen und hierauf in drei gleich grosse Segmente geteilt. Jedes dieser Segmente wurde hierauf im Mörser in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und im Mäuseversuch auf Toxin geprüft.

Der Versuchsausfall ist aus Tabelle II ersichtlich.

Der Versuchsausfall lehrte, dass die verwendete Toxinmenge mit einer Adsorptionsschicht von nur 2,5 cm Höhe nicht restlos zurückgehalten werden kann, da eine gewisse Toxinquote in das Filtrat überging; auch in Versuch 15, in dem eine 5 cm hohe Adsorptionssäule verwendet wurde, war das Filtrat nicht völlig frei von Toxin. Dagegen erfolgte in den Versuchen 14—16 eine völlige Adsorption, wobei das Toxin in seiner Hauptmenge in den

obersten Segmenten adsorbiert wurde, ein Befund, der schon auf Grund der Fluoreszenz dieser oberflächlichen Schichten im Ultraviolettlicht erwartet werden konnte.

Tabelle II

Versuchsserie 12—16

Tetanustoxin 1 : 50
Adsorbens: $Al(OH)_3$
Höhe der Adsorptionsschicht 2,5 bzw. 5 cm

Versuchs-Nr.		12	13	14	15	16
Eingangs-pH		6,15	6,15	6,1	6,0	5,9
Ausgangs-pH		6,7	7,55	7,5	7,4	7,3
Toxingehalt der Adsorptions-Segmente	2,5 cm		† 1	† 1	† 1	† 1
	2,5 cm	† 1	† 1	† 3	† 5	—
		† 1	† 2	—	—	—
		† 1				
Toxingehalt des Filtrates	1 : 100	† 2	† 5	—	—	—
	1 : 1 000			—	—	—
	1 : 10 000			—	—	—

3. Versuchsserie. Es sollte geprüft werden, ob auch grössere Toxinmengen quantitativ adsorbiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Toxin während der Adsorption nur im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Im übrigen wurde dieselbe Versuchsanordnung eingehalten.

Die in Tabelle III zusammengestellten Versuchsergebnisse zeigen, dass die Adsorption in diesem Fall nur sehr unvollständig war, indem eine ansehnliche Toxinmenge im Filtrat nachzuweisen war.

Tabelle III

Versuchsserie 17—20

Tetanustoxin 1: 10
Adsorbens: $Al(OH)_3$
Höhe der Adsorptionsschicht 5 cm

Versuchs-Nr.		17	18	19	20
Eingangs-pH		6,0	5,9	5,75	4,8
Ausgangs-pH		7,5	7,45	7,4	
Toxingehalt der Adsorptions-Segmente	5 cm	† 1	† 1	† 1	† 1
		† 1	† 1	† 1	† 1
		† 1	† 1	† 2	† 1
Toxingehalt des Filtrates	1: 20	† 1	† 1	† 1	† 1
	1: 600	† 2	† 2	† 5	† 1
	1: 10 000	† 5	—	—	—

4. Versuchsserie. Für die mangelhafte Adsorption in den vorherigen Versuchen konnte — mit Wahrscheinlichkeit — die während des Adsorptionsvorganges wiederum aufgetretene pH-Verschiebung nach der alkalischen Seite verantwortlich gemacht werden. Es wurde daher versucht, den gewünschten pH durch eine ausgiebige Vorbehandlung der Adsorptionssäule mit je 130 cc Pufferlösung von verschiedenem pH während des ganzen Versuches zu stabilisieren. Zur Adsorption gelangte in diesen Versuchen ein noch schwächer (1 : 5) verdünntes Tetanustoxin.

Wie aus Tabelle IV ersichtlich ist, gelang es in diesem Fall, eine quantitative Adsorption zu erzielen unter der Voraussetzung, dass der pH kleiner als 6,5 und während der ganzen Versuchsdauer nahezu konstant blieb.

Tabelle IV

Versuchsserie 21—28

Tetanustoxin 1:5
Adsorbens: $Al(OH)_3$
Schichthöhe: 5 cm

Versuchs-Nr.		21	22		23	24	25	26	27	28
Eingangs-pH		7,5	5,7		7,0	6,5	5,9	5,3	4,9	4,5
Ausgangs-pH		7,65	6,2		7,05	6,7	6,1	5,3	5,1	4,85
Toxingehalt der Adsorptionssäule	5 cm	† 1	† 1		† 1	† 1	† 1	† 1	† 1	† 1
		† 1	† 1		† 1	† 1	† 1	† 2	† 1	† 1
		† 1	† 2		† 1	† 1	—	—	† 1	† 1
Toxingehalt des Filtrates	1:10	† 1	—	1:10	† 1	† 1	—	—	—	—
	1:300	† 1	—	1:500	† 1	† 1	—	—	—	—
	1:5000	† 1	—	1:10 000	† 4	† 5	—	—	—	—

5. Versuchsserie. In diesen Versuchen sollte ermittelt werden, ob sich auch unverdünntes Tetanustoxin in der Adsorptionssäule verlustlos anreichern lässt, falls ein optimaler und konstanter pH gewährleistet wird. Fernerhin sollte festgestellt werden, wie hoch die Adsorptionsschicht zur Erzielung einer quantitativen Adsorption sein muss und mit welcher Tenazität das einmal adsorbierte Toxin am Adsorbens festgehalten wird.

Tabelle V

Versuchsserie 29—33

Tetanustoxin unverdünnt
Adsorbens: $Al(OH)_3$
Schichthöhe: 6, 9, 11 und 12 cm

Versuchs-Nr.		29	30	31	32	33
Eingangs-pH		5,45	5,8	5,8	5,8	5,7
Toxingehalt der Adsorptionssäule		6 cm † 1	6 cm † 1	9 cm † 1	11 cm † 1	12 cm † 1
		† 1	† 1			† 1
		† 1	† 1			† 1
		† 1	† 1	† 1	† 1	† 2
Toxingehalt des Filtrates	1 : 2	† 1	† 1	—	—	—
	1 : 500	† 3	† 3	—	—	—
	1 : 10 000	—	—	—	—	—

Versuchsanordnung: Je 25 cc angesäuertes, unverdünntes Tetanustoxin wurden durch ausgiebig mit Pufferlösung (pH: 5,8 bis 5,45) vorbehandelte Adsorptionssäulen verschiedener Höhe (6, 9, 11 und 12 cm) hindurchgeschickt und hierauf der Toxingehalt

in den verschiedenen Segmenten der Adsorptionssäule und im Filtrat in der üblichen Weise bestimmt (vgl. Tabelle V). In einigen Versuchen, in denen eine maximale Adsorption stattgefunden hatte, wurde die Adsorptionssäule mit 40 cc Pufferlösung nachgespült und bestimmt, welche Toxinmengen noch nachträglich in das Filtrat übergehen.

Die erzielten Versuchsergebnisse lassen sich dahin zusammenfassen, dass eine Adsorptionssäule von nur 6 cm Höhe zur völligen Adsorption von relativ grossen Toxinmengen (25 cc unverdünntes Toxin) nicht ausreicht, dass dagegen eine komplette Adsorption zu erzielen ist, wenn höhere Adsorptionsschichten (Säulen von 9, 11 und 12 cm Höhe) verwendet werden. Fernerhin konnte festgestellt werden, dass durch die Nachbehandlung der Adsorptionssäule mit Pufferlösung von saurem pH (5,8) noch grössere Toxinmengen — zumindest, wenn die Adsorptionsschicht nur geringe Schichthöhe hat — vom Adsorbens gelöst werden können, ein Umstand, der wohl darauf hinweist, dass die adsorbierende Kraft von Aluminiumhydroxyd relativ geringfügig ist.

6. Versuchsserie. Nachdem festgestellt wurde, dass das bisher verwendete Adsorbens verhältnismässig geringe Adsorptionskraft besitzt, wurde ein anderes Adsorbens, nämlich Al oxydat. puriss. (Al_2O_3) von Merck verwendet.

Das Adsorptionsmittel wurde fernerhin — in Abänderung der bisherigen Versuchsanordnung — in Form einer Aufschwemmung in saurer Pufferlösung in die Adsorptionsröhren eingefüllt und die gebildete Säule mittels Durchsaugen ausgiebiger Mengen von saurer Pufferlösung nachgespült. Die adsorbierenden Schichthöhen variierten zwischen 5 und 7,5 cm. In den Versuchen wurden 20, 25 und 100 cc von grösstenteils unverdünntem Tetanustoxin der strömenden Adsorption unterworfen. Der Toxinnachweis in den einzelnen Segmenten der Adsorptionssäule und im Filtrat erfolgte in der bisher üblichen Art.

Über die erzielten Versuchsergebnisse orientiert Tabelle VI.

Die überlegene Adsorptionskraft von Aluminiumoxyd ist ohne weiteres ersichtlich; bei einem pH $< 6{,}0$ genügte die kurze Adsorptionsschicht von 6 cm, um relativ grosse Mengen von unver-

Tabelle VI

Versuchsserie 34—40

Tetanustoxin unverdünnt
Adsorbens: Al_2O_3
Schichthöhe: 5, 6, 6,5 und 7,5 cm

Versuchs-Nr.		34	35	36	37	38	39	40
Eingangs-pH		6,3	6,5	5,8	5,8	5,8	6,7	6,5
Ausgangs-pH		6,3	6,55	5,8	6,6	6,2	6,7	6,5
Toxinmenge		20 cc	20 cc	20 cc	25 cc	100 cc	20 cc	20 cc
Toxinverdünnung		1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 5	1 : 1	1 : 5	1 : 1
Toxingehalt der Adsorptionssäule		5 cm	6 cm	6 cm	6 cm	6 cm	6,5 cm	7,5 cm
			† 1	† 1	† 1		† 1	† 1
			† 1				† 1	
			† 1	† 2	—		† 1	† 1
			† 1	—	—		† 1	
Toxingehalt des Filtrates	1 : 2	+	† 2	—	—	† 2 (1 : 1)	† 2 (1 : 10)	† 1
	1 : 500	—	+	—	—	—	+	† 4
	1 : 10 000	—	—	—	—	—	—	—

dünntem Toxin — 20 bzw. 100 cc — restlos bzw. zum grossen Teil zurückzuhalten. Bei totaler Adsorption erfolgte die Toxinbindung wiederum in den obersten Schichten der Adsorptionssäule.

7. Versuchsserie. Nachdem in den bisherigen Versuchen der Toxinnachweis in den verschiedenen Segmenten der Adsorptionssäule nur qualitativ geführt wurde, sollten die nachfolgenden Versuche darüber Aufschluss geben, welche Toxinmenge in den einzelnen Schichtsegmenten adsorbiert wird.

Versuchsanordnung. Als Adsorbens diente wiederum Aluminiumoxyd. Auch die Art, wie die Adsorptionssäulen hergestellt wurden, war dieselbe wie im vorherigen Versuch. Die Schichthöhe betrug 8 cm. Der pH im Adsorptionsmilieu wurde mit Phosphatpuffer auf 5,7 eingestellt. Zur Adsorption kamen je 100 cc Tetanustoxin, das im einen Fall unverdünnt verwendet, im andern mit Phosphatpufferlösung auf 500 cc verdünnt wurde. Nach der Passage dieser Toxinmenge wurde die Adsorptionssäule in drei gleich grosse Segmente zerlegt, das Adsorbens jedes Segmentes gewogen und mit der neunfachen Gewichtsmenge Kochsalzlösung, die mit Ammoniak gegenüber Lackmus leicht alkalisch gemacht wurde, eluiert. Die einzelnen Eluate wurden hierauf in Verdünnungen von 1 : 10 000 bis 1 : 250 000 im Mäuseversuch auf Toxingehalt geprüft.

Über die in den einzelnen Adsorptionssegmenten aufgefundenen Toxinmengen gibt Tabelle VII Auskunft.

Diese Versuche bestätigten demnach wiederum, dass grosse Toxinmengen durch Adsorptionssäulen von verhältnismässig geringer Schichthöhe komplett adsorbiert werden. Die Hauptmenge des Toxins wurde in den obersten Schichten in enger Zone zurückgehalten und dort auch beträchtlich — um ca. das Zehn- bis Zwölffache — angereichert. Die Elution erwies sich allerdings als höchst unvollkommen, indem von den rechnungsgemäss adsorbierten 2 500 000 Giftdosen nur 300 000 letale Dosen rekuperiert werden konnten.

Tabelle VII

Versuchsserie 41—42

Tetanustoxin 100 cc, 1:1 bzw. 1:5
Adsorbens: Al_2O_3
Schichthöhe: 8 cm

Versuchs-Nr.			41	42
Eingangs-pH			5,7	5,7
Ausgangs-pH			5,8	5,8
Toxinmenge			100 cc	100 cc
Toxinverdünnung			1:1	1:5
Toxingehalt der Adsorptionssäule	oberes 1/3 Segment	1:10 000	† 2	† 2
		1:50 000	† 2	† 1
		1:100 000	† 3	† 2
		1:250 000	+	† 2
	mittleres 1/3 Segment	1:10 000	† 2	† 6
		1:50 000	† 6	—
		1:100 000	—	—
		1:250 000	—	—
	unteres 1/3 Segment	1:10 000	—	—
		1:50 000	—	—
		1:100 000	—	—
		1:250 000	—	—
Toxingehalt im Filtrat		1:1	—	—
		1:10	—	—
		1:100	—	—
		1:1000	—	—

Versuche mit Diphtherietoxin

1. Versuchsserie. Ein Diphtherietoxin (Nr. 209), von welchem $^1/_{2000}$ cc bei subkutaner Applikation Meerschweinchen von 250 g am 2. Tag und $^1/_{10\,000}$ cc am 5. Tag tötete, wurde nach Massgabe der vorherigen Versuche bei unterschiedlichem pH «chromatographiert».

Der Versuchsausfall deckte sich — wie Tabelle VIII zeigt — weitgehend mit den Ergebnissen der Tetanustoxinversuche.

Diphtherietoxin wird demnach ebenfalls bei einem pH $< 6{,}0$ optimal adsorbiert und lässt sich in diesem Fall nur in den obersten Schichten des «Chromatogrammes» nachweisen.

Tabelle VIII

Versuchsserie 1—4

Diphtherietoxin unverdünnt
Adsorbens: Al_2O_3
Schichthöhe: 6—7 cm

Versuchs-Nr.		1	2	3	4
Eingangs-pH		6,4	5,9	5,5	5,3
Ausgangs-pH		6,4	6,1	5,7	5,3
Toxinmenge		20 cc	20 cc	20 cc	20 cc
Toxingehalt der Adsorptionssäule	oberes $^1/_3$ Segment	† 1	† 2	† 1	† 1
	mittleres $^1/_3$ Segment	† 1	—	—	—
	unteres $^1/_3$ Segment	† 2	—	—	—
Toxingehalt im Filtrat		—	—	—	—

2. Versuchsserie. In zwei Versuchen sollte festgestellt werden, in welchen Mengen das adsorbierte Diphtherietoxin durch Elution aus den einzelnen Segmenten der Adsorptionssäule wieder gewonnen werden kann. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie in den Versuchen 41 und 42.

Tabelle IX

Versuchsserie 5—6

Diphtherietoxin unverdünnt
Adsorbens: Al_2O_3
Schichthöhe: 7—8 cm

Versuchs-Nr.			5	6
Eingangs-pH			5,7	5,7
Ausgangs-pH			5,7	5,7
Toxinmenge			100 cc	100 cc
Toxingehalt im Eluat der Adsorptionssäule	oberes $^1/_3$ Segment	1 : 10	† 1	† 2
		1 : 100	† 2	† 5
		1 : 1 000	—	—
		1 : 10 000	—	—
		1 : 100 000	—	—
		1 : 500 000	—	—
	mittleres $^1/_3$ Segment	1 : 10	† 2	—
		1 : 100	—	—
		1 : 1 000	—	
		1 : 10 000	—	
		1 : 100 000	—	
		1 : 500 000	—	
	unteres $^1/_3$ Segment	1 : 10	—	—
		1 : 100	—	
		1 : 1 000	—	
		1 : 10 000	—	
Toxingehalt im Filtrat		1 : 1	—	—

In Tabelle IX sind die Resultate dieser Versuche wiedergegeben.

Der Ausfall dieser Versuche war insofern überraschend, als nur ein höchst geringfügiger Anteil des in den obersten Segmenten komplett adsorbierten Toxins nach der Elution nachgewiesen werden konnte. Ob diese Verluste durch eine ungenügende Elution oder durch eine — zufolge der Säuerung — aufgetretene Toxoidbildung bedingt wurden, liess sich in diesen Versuchen nicht entscheiden.

3. Versuchsserie. Bei den in dieser Versuchsreihe angestellten drei Versuchen wurde die Adsorption von je 100 cc unverdünntem Diphtherietoxin unter den gleichen Versuchsbedingungen (Al_2O_3, Schichthöhe 6 cm, pH 5,7) durchgeführt.

Abgeändert wurde lediglich die Art der Elution, indem das oberste Segment der Adsorptionssäule (ca. 3 g) mit der 2½fachen Gewichtsmenge des Elutionsmittels — 4 %, 8 %, 16 % Natr. phosphor. sicc. — versetzt, nach häufigem Durchschütteln und Stehenlassen im Eisschrank über Nacht zentrifugiert wurde.

Die gewonnenen Eluate wurden hierauf — im Vergleich mit dem Ausgangstoxin bzw. dem auf pH 5,7 angesäuerten Toxin — im Flockungsversuch auf den Gehalt an Diphtherietoxin geprüft.

Die hierbei erzielten Flockungswerte waren die folgenden:

Tabelle X

Flockungsantigen	Flockungseinheiten	Flockungszeit
Ausgangstoxin	27,5 E	6 Std. 22 Min.
Toxin pH 5,7	?	> 8 Std.
Eluat 4 %	> 60 E < 90 E	1 Std. 58 Min.
Eluat 8 %	> 60 E < 90 E	1 Std. 53 Min.
Eluat 16 %	> 90 E < 130 E	1 Std. 45 Min.

Der Ausfall der Flockungsversuche lässt keinen Zweifel darüber, dass auch Diphtherietoxin mit Hilfe der strömenden Adsorption in erheblichem Grade konzentriert werden kann; während im Ausgangstoxin nur 27,5/1 cc Flockungseinheiten enthalten waren, hatte das beste Eluat 90—130 Flockungseinheiten in 1 cc. Die Toxinverluste sind allerdings — zumindest, falls das Toxin eluiert werden soll — beträchtlich; von den insgesamt 2750 Flockungseinheiten wurden nämlich nur ca. 720 Flockungseinheiten rekuperiert, so dass demnach ca. $^3/_4$ des Toxins bzw. Toxoids am eluierten Adsorbens zurückblieb.

4. Versuchsserie. In diesen Versuchen sollte die Frage entschieden werden, ob auch die Chromatographie von *Diphtherieformoltoxoid* zu einer Anreicherung führt. Die Versuchsanordnung deckte sich mit der vorherigen, mit der einen Modifikation, dass als Elutionsmittel 6 % Na_2HPO_4 bzw. 0,3 % und 0,5 % NH_3-Lösungen verwendet wurden. Das Ergebnis des Flockungsversuches ist in Tabelle XI angeführt.

Tabelle XI

Flockungsantigen	Flockungseinheiten	Flockungszeit
Ausgangsanatoxin . .	~ 33 E	ca. 3 Std.
Anatoxin pH 5,7 . . .	~ 29 E	ca. 3 Std.
Eluat 6 % Na_2HPO_4	~ 70 E	ca. 2 Std.
Eluat 0,3 % NH_3 . .	~ 70 E	ca. 2 Std.
Eluat 0,5 % NH_3 . .	~ 50 E	2 Std.

Der Versuch zeigt, dass auch eine Konzentrierung von Diphtherie-Anatoxin möglich ist. Bei einer Verdoppelung der Anzahl der Flockungseinheiten war allerdings auch hier nur $^1/_3$ des gesamten adsorbierten Toxoids im Eluat nachzuweisen.

Zusammenfassung

1. Die Frage, ob die Methodik der strömenden Adsorption (Chromatographie) für die Anreicherung bakterieller Toxine (Tetanus-, Diphtherietoxin und Diphtherie-Anatoxin) mit Vorteil verwendet werden kann, wurde durch eine Reihe von Versuchen zu klären versucht.

2. Die Versuchsbedingungen, unter denen eine optimale Adsorption zu erreichen ist, wurden eingehend studiert und hierbei festgestellt, dass nicht nur die Art des Adsorbens, sondern vor allem die Wasserstoffionenkonzentration im Adsorptionsmilieu einen entscheidenden Einfluss haben. Die besten Adsorptionsresultate wurden mit Aluminiumoxyd (Al_2O_3) als Adsorbens und einer Wasserstoffionenkonzentration von pH 6,0—5,3 erzielt.

3. Unter optimalen Versuchsbedingungen wurden die untersuchten Toxine und Toxoide in den obersten Schichten der Adsorptionssäule in eng umschriebener Zone adsorbiert und daselbst in beträchtlichem Grade angereichert.

4. Die Elution des adsorbierten Toxins bzw. Toxoids gelang dagegen nur unter grossen Verlusten.

5. Auf Grund der vorliegenden Versuche dürfte sich die chromatographische Adsorptionsmethode sehr wohl zur Konzentrierung und wahrscheinlich auch zur Reinigung bakterieller Toxine und Toxoide eignen.

Literatur

1) *Tswett:* Ber. Dtsch. bot. Ges. *24*, 384 (1906).

2) *Zechmeister* und *von Cholnoky:* Die chromatographische Adsorptionsmethode. 2. Auflage. Verlag Julius Springer 1938.

3) *Gözsy* und *Vásárhelyi:* Zschr. Imm.-Forschg., *97*, 265 (1939).